

VERSUCHE ZUR GESTEIGERTEN BILDUNG
VON HAMMONDIA HAMMONDI-ZYSTEN
IN NMRI-MÄUSEN DURCH IMMUNSUPPRESSIVA

Heilwig Bruse

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552316_0071

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

VERSUCHE ZUR GESTEIGERTEN BILDUNG
VON HAMMONDIA HAMMONDI-ZYSTEN
IN NMRI-MÄUSEN DURCH IMMUNSUPPRESSIVA



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Heilwig Bruse
aus
Itzehoe

München 1978

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität
München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch
Korreferent: Prof. Dr. K. Tempel

Tag der Promotion: 28. Juli 1978



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I Einleitung	1
II Hammondia-Infektion bei Tieren und deren Nachweis sowie Möglichkeiten der Antigengewinnung mit Hilfe von Immunsuppressiva (anhand der Literatur)	2
III Eigene Untersuchungen	15
A Material und Methodik	15
B Ergebnisse	21
1. Röntgenstrahlen	21
2. Pharmaka	24
a) Betametasondinatriumphosphat	24
b) Cyclophosphamid	26
c) Azathioprin	29
d) Vincristin ^(R)	29
3. Antilymphozytenserum	29
4. Überprüfung des Antigens im indirekten Fluoreszenztest	33
IV Besprechung der Ergebnisse	35
V Zusammenfassung und Summary	39
VI Literaturverzeichnis	41
Lebenslauf	

I EINLEITUNG

Hammondien sind den Toxoplasmen nahe verwandte zystenbildende Kokzidien. Bisher sind 2 Arten bekannt. Für *Hammondia heydorni* sind Rind und Schaf Zwischenwirte und Hunde Endwirte. *Hammondia hammondi* macht in der Katze die geschlechtliche Entwicklung durch, als Zwischenwirte fungieren verschiedene kleine Nager.

Beide Arten sind in ihrer Morphologie den Entwicklungsstadien von *Toxoplasma gondii* so ähnlich, daß man weder die Zystozoiten noch die Oozysten lichtmikroskopisch unterscheiden kann. Es ist anzunehmen, daß die von der Katze mit dem Kot ausgeschiedenen Toxoplasma-ähnlichen Oozysten teilweise tatsächlich Toxoplasmen und teilweise hygienisch unbedenkliche Hammondien sind. Auch eine serologische Differenzierung der zwei Parasiten ist schwierig, da Kreuzreaktionen auftreten. Dadurch könnten bei für *Hammondia* empfänglichen Labor- und Haustierarten die Ergebnisse der Toxoplasmose-Serologie verfälscht werden. Ob Hammondien im Menschen zur Bildung von Antikörpern führen, die dann als Toxoplasma-Titer interpretiert würden, ist nicht geklärt. Bei mit *Toxoplasma gondii* oder mit *Hammondia hammondi* experimentell infizierten NMRI-Mäusen erwies sich lediglich der Fluoreszenztest bei Verwendung von Toxoplasma-Antigen spezifisch. Der Beweis, daß der IFAT auch spezifisch ist bei der Verwendung von *Hammondia*-Antigen, konnte bisher nicht erbracht werden, da *Hammondia*-Antigen in der erforderlichen Menge und Reinheit nicht zur Verfügung steht.

Ich erhielt die Aufgabe, durch Behandlung von NMRI-Mäusen mit Immunsuppressiva eine starke Bildung von *Hammondia*-Zysten zu provozieren und damit die Durchführung des Fluoreszenztestes zu ermöglichen.

II Hammondia-Infektionen bei Tieren und deren Nachweis sowie Möglichkeiten der Antigengewinnung mit Hilfe von Immunsuppressiva (anhand der Literatur)

Als WALLACE (1973) in Hawai Katzenkotproben systematisch auf Toxoplasma gondii-Entwicklungsstadien untersuchte, entdeckte er Oozysten, die denen von Toxoplasma gondii zwar morphologisch glichen, sich aber biologisch und serologisch deutlich von Toxoplasma gondii unterschieden. Er nannte den neuen Parasiten zunächst einmal "WC 1170". FRENKEL und DUBEY (1975 a) fanden bei Katzenkotüberprüfungen in Iowa ebenfalls derartige Toxoplasma-ähnliche Oozysten. Sie untersuchten den Lebenszyklus und konnten dabei Unterschiede gegenüber Toxoplasmen feststellen. Sie bezeichneten diese zystenbildende Kokzidienart als Hammondia hammondi. ROMMEL und v. SEYERL (1976) wiesen schließlich Hammondia hammondi erstmals in Europa nach. EYDELLOTH (1977) stellte für diesen Parasiten der Katze verschiedene kleine Nager als Zwischenwirte fest. FRENKEL (1977) ordnete die Hammondien systematisch der Familie Sarcocystidae und der Unterfamilie Toxoplasmatinae bei.

HEYDORN (1973) sowie HEYDORN, GESTRICH und IPCZYNSKI (1975) stellten für die bisher als kleine Form von Isospora bigemina bezeichnete Kokzidienart des Hundes fest, daß sich im Endwirt nur dann Oozysten entwickeln, wenn Zysten aus dem Zwischenwirt Rind aufgenommen wurden. TADROS und LAARMANN (1976) bezeichneten diese Art als Hammondia heydorni. DUBEY und FAYER (1976) konnten ebenfalls Kälber als Zwischenwirte für Hammondia heydorni feststellen. TADROS und LAARMANN (1976) stellten auch das Schaf in die Reihe der Zwischenwirte für Hammondia hammondi.

Einzelheiten der Entwicklung von Hammondia hammondi haben WALLACE (1973, 1975) sowie FRENKEL und DUBEY (1975 b) im wesentlichen aufgeklärt. Die Katze scheidet mit dem Kot unsporulierte Toxoplasma-ähnliche Oozysten aus, welche in der Aussenwelt bei 20 - 23° C innerhalb 3 Tagen sporulieren. Die infektiöse Oozyste enthält zwei Sporozysten (Isosporatyp) mit je 4 Sporozoiten. Werden diese sporulierten Oozysten von kleinen Nagern, den für diese Hammondia-Art spezifischen Zwischenwirten, oral aufgenommen, werden im Darm Sporozoiten freigesetzt, dringen in die Epithelzellen ein und vermehren sich durch Endodyogenie. Die entstehenden Endozoiten befallen die Lamina propria, Lamina muscularis sowie die Mesenteriallymphknoten und die Peyerschen Platten. Hier vermehren sie sich erneut durch Endodyogenie, die sich entwickelnden Endozoiten (wegen ihrer schnellen Vermehrung vielfach auch als Tachyzoiten bezeichnet) gelangen dann vermutlich auf dem Lymph- und Blutwege in die quergestreifte Muskulatur, wo sie ab 11. Tag post infectionem als Zysten erkannt werden. Einige wenige Hammondia-Zysten entwickeln sich auch im Herzmuskel und ausnahmsweise im Gehirn. In den Zysten erfolgen ständige Endodyogenien, so daß sie allmählich eine große Zahl von Zystozoiten (wegen der langsamen Vermehrung auch als Bradyzoiten bezeichnet) enthalten. Nimmt der Endwirt Katze Zystenträger (Zwischenwirte) auf, so werden im Jejunum die Zystozoiten frei, dringen in das Dünndarmepithel ein und vermehren sich durch Schizogonie. Bei starker Infektion ist um den 5. und 6. Tag p. i. der ganze Dünndarm besetzt. Danach kommt es, wie bei Toxoplasma, zur Bildung von Makro- und Mikrogamonten (Gamogonie), die FRENKEL und DUBEY (1975 a) zwischen dem 5. - 10. Infektionstage beobachteten. Die infizierten Katzen schei-

den bereits ab 6. Tage p. i. für 12 bis 28 Tage unsporulierte Oozysten aus.

Die Morphologie der Hammondien haben FRENKEL und DUBEY (1975 a, 1975 b) sehr genau beschrieben. Die Oozysten sind rundlich bis oval und $10,6 \times 11,4 \mu\text{m}$ ($10,5\text{--}12,5 \times 11,2\text{--}13,3 \mu\text{m}$) groß. Die Oozystenwand ist farblos, circa $0,5 \mu\text{m}$ dick und besteht aus zwei Lagen; Mikrophyle und Polargranula fehlen. Der gleichförmig gekörnte Sporont füllt zu 90 % die Oozyste aus. Die sporulierte Oozyste dagegen ist oval bis elliptisch, $10,6 \times 13,2 \mu\text{m}$ ($10,0\text{--}10,7 \times 16,2\text{--}13,8 \mu\text{m}$) groß und enthält keinen Oozystenrestkörper. Die Sporozysten messen $6,5 \times 9,8 \mu\text{m}$ ($6,0\text{--}7,5 \times 8,0\text{--}10,7 \mu\text{m}$) und besitzen keine Stiedakörperchen, jedoch einen Sporozystenrestkörper. Die Sporozoiten sind leicht gebogen und etwa $2 \times 7 \mu\text{m}$ groß; ihr Kern liegt zentral.

Die Muskelzysten erreichen Größen von $90 \times 340 \mu\text{m}$ und sind nicht gekammert; die Zystenwand ist etwas weniger dick als $0,5 \mu\text{m}$. Die Zystozoiten sind schlank und $2 \times 7 \mu\text{m}$ groß. Metrozyten, wie bei Sarkosporidien, wurden nicht beobachtet.

Die Ultrastruktur der Sporozoiten und Endozoiten von *Hammondia hammondi* entspricht nach Untersuchungen von SHEFFIELD, MELTON und NEVA (1976) derjenigen von *Toxoplasma gondii*. Sie fanden, daß die Pellicula aus einer äußeren Elementarmembran und zwei inneren Membranen besteht. Daneben hat der Sporozoit ein Conoid, Rhoptrien und eine Mikropore. In den *Hammondia*-Sporozoiten treten häufig Polysaccharidgrana auf. Sie kommen auch bei anderen Sporozoen vor und werden allgemein als Reservestoffe angesehen.

Hammondia hammondi unterscheidet sich von *Toxoplasma gondii* vor allem durch den obligat zweiwirtigen Zyklus. Eine Übertragung des Parasiten von Zwischenwirt zu Zwischenwirt oder auch von Endwirt zu Endwirt ist nicht möglich. WALLACE (1973) konnte Mäuse weder oral noch intraperitoneal mit Zysten infizieren. Ebenfalls mißlang es FRENKEL und DUBEY (1975 a), Katzen oral und subcutan mit *Hammondia*-Oozysten zu infizieren, ebenso wie die orale Ansteckung von Mäusen mit Endozoiten.

Auch der Versuch, Endozoiten aus Mesenteriallymphknoten von Mäusen oral und intraperitoneal auf andere Mäuse zu übertragen, brachte kein positives Ergebnis. Ebenso gelang ROMMEL und v. SEYERL (1976) eine Infektion von Maus zu Maus weder durch intraperitoneale Injektion von Gehirn-, Leber-, Lungen- oder Nierenmaterial, noch von Endozoitenhaltigen Muskelsuspensionen. Schließlich schlossen DUBEY und STREITEL (1976) eine intrauterine Übertragung von *Hammondia hammondi* in Mäusen aus. Sie fütterten tragende Mäuse mit *Hammondia hammondi*-Oozysten und verfütterten die aufgezogenen Jungmäuse an Katzen; keine dieser Katzen schied jedoch *Hammondia*-Oozysten aus.

Mit dem Wirtspektrum von *Hammondia hammondi* beschäftigen sich viele Autoren. FRENKEL und DUBEY (1975 a) geben als Endwirt die Hauskatze (*Felis catus*) an; als Zwischenwirte ermittelten sie die weiße Maus (*Mus musculus*), weiße Ratten (*Rattus norvegicus*), Meerschweinchen (*Cavia coby*), Goldhamster (*Mesocricetus auratus*), amerikanische Hirschmäuse (*Peromyscus maniculatus*) und Vielzitzenmäuse (*Mastomys maniculatus*). Tauben schlossen sie als Zwischenwirte ebenso aus wie WALLACE (1975) Affen (*Macaca irus*) und japanische Wachteln (*Coturnix coturnix japonica*) sowie DUBEY und STREITEL (1976) Hühnerküken. DUBEY (1975 b)

infizierte oral Hunde mit *Hammondia hammondi*-Oozysten; das Fleisch dieser Hunde verfütterte er später an drei Katzen. Zwei davon schieden nach 8 - 10 Tagen *Hammondia*-Oozysten aus. Schließlich konnte EYDELLOTH (1977) zusätzlich zur Hauskatze auch die Wildkatze (*Felis silvestris*) als Endwirt für *Hammondia hammondi* feststellen. Als weitere Zwischenwirte erwiesen sich Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*), Erdmaus (*Microtus agrestis*), Feldmaus (*Microtus arvalis*), Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*), Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*) und der Großhamster (*Crice-tus cricetus*). Ferner entwickelten zwei von drei vor Versuchsbeginn im Sabin Feldman -Test (SFT) negative Kaninchen nach Fütterung mit 40.000 sporulierten Oozysten nach fünf Wochen Titer von 1:64. Nach der Verfütterung von Muskulatur und Organanteilen der positiven Kaninchen schieden 2 junge parasitenfreie Katzen nach einer verlängerten Präpatenzzeit von 10 - 12 Tagen unsporulierte *Hammondia*-Oozysten aus, die durch serologische Tests als *Hammondia hammondi* identifiziert wurden. Auch 2 von 5 Schweinen entwickelten nach Verabreichung von *Hammondia*-Oozysten niedrige Titer; bei Verfütterung von Fleisch dieser beiden bewirkte nur ein Schwein bei einer von 2 Katzen eine Ausscheidung von Oozysten. Die Präpatenz war mit 17 Tagen ungewöhnlich lang.

Die Infektion mit *Hammondia*-Oozysten verläuft bei der Katze symptomlos (DUBEY, 1976). Dagegen beobachtete WALLACE (1976) bei infizierten Mäusen Myositis und Myocarditis; auch starben einige Mäuse 6 - 10 Tage nach der Ansteckung. FRENKEL und DUBEY (1975 a) berichten, daß nach oraler Infektion mit 100.000 - 1.000.000 Oozysten Mäuse klinisch erkrankten und 30 % der Tiere nach 6 - 10 Tagen starben. Infektionsdosen von 1.000 - 10.000 *Hammondia*-Oozysten

riefen keine Symptome hervor, obwohl durch histologische Untersuchungen Zellläsionen im Darmtrakt nachgewiesen werden konnten. Dagegen hinterließen 100 Oozysten keine Zellnekrosen. ROMMEL und v. SEYERL (1976) beobachteten als Symptome einer Hammondiose bei Mäusen Apathie, Anorexie und gesträubtes Fell.

DUBEY (1975 a) beschäftigte sich mit der Immunität bei mit *Hammondia hammondi* infizierten Katzen. Er stellte fest, daß Katzen auch nach wiederholter Infektion mit *Hammondia hammondi* Oozysten ausscheiden. Allerdings verlängerte sich die Präpatenzzeit um etwa das Doppelte und die Gesamtzahl der ausgeschiedenen Oozysten sank um das Zehn- bis Hundertfache im Vergleich zur allerersten Infektion. EYDELLOTH (1977) dagegen berichtete, daß zumindest ältere Katzen, die einmal *Hammondien* ausgeschieden haben, bei erneuter Infektion keine Oozysten mehr produzieren.

Die von der Katze ausgeschiedenen unsporulierten Oozysten von *Toxoplasma gondii* und *Hammondia hammondi* gleichen sich vollkommen, auch die in Mäusen gebildeten Muskelzysten dieser beiden Arten sind lichtmikroskopisch nicht zu unterscheiden; in jedem Falle lassen sich aber die beiden Parasiten mit serologischen Verfahren differenzieren. Seren von *Hammondia*-infizierten Mäusen reagieren mit *Toxoplasma*-Antigen im SFT entweder gar nicht oder nur mit Titern von 1:4 - 1:256 (DUBEY, 1975 a; ROMMEL und v. SEYERL, 1976), während *Toxoplasma*-infizierte Mäuse in der Regel Titer von 1:16.000 und höher entwickeln. Ähnliches gilt für den Endwirt. Mit *Hammondia* experimentell angesteckte Katzen bildeten keine im SFT nachweisbaren Antikörper gegen *Toxoplasma* - Antigen (FRENKEL und DUBEY, 1975 a; WAL-LACE, 1975; EDELLOTH, 1977); dagegen waren Versuchskat-

zen mit einer Toxoplasma-Infektion in der Regel SFT-positiv. Bei anderen Tierarten (Zwischenwirte) stellte EYDELLOTH (1977) ebenfalls Kreuzreaktionen im SFT mit Toxoplasma fest. So entwickelten Kaninchen Titer bis 1:64, Schweine Titer von 1:16, Schafe bis 1:256. Die Präpatenzzeit beträgt bei Toxoplasma gondii (nach Zystenaufnahme) 2 - 4 Tage (BOCH und Mitarbeiter, 1974), bei Hammondia-infizierten Katzen mindestens 6 Tage (FRENKEL, 1977).

Das Wirtsspektrum für Hammondia hammondi ist mit Haus- und Wildkatze als Endwirten und verschiedenen kleinen Nagern als Zwischenwirten bedeutend enger als das für Toxoplasma gondii. Für dieses sind neben der Katze Rotluchs (Lynx concolor), Leopard (Felis bengalensis), Ozelot (Felis pardalis), Wieselkatze (Herpailuris yagouaroundi) Endwirte (MILLER, FRENKEL, DUBEY, 1972). Als Zwischenwirte für Toxoplasma kommen fast alle warmblütigen Tiere und einige Vogelarten in Frage (BOCH und SUPPERER, 1977; TADROS und LAARMAN, 1976).

Die Diagnose von Hammondia-Infektionen ist zur Zeit noch schwierig und aufwendig, da sie nur mit Hilfe eines kombinierten biologischen und serologischen Tests gestellt werden kann. Um sicher zu gehen, daß es sich bei den von Katzen ausgeschiedenen, weniger als 15 µm großen unsporulierten Oozysten um Hammondien und nicht um Toxoplasmen handelt, müssen sporulierte Oozysten oral an Mäuse verabreicht werden. 4 - 6 Wochen später ist Serum dieser Testmäuse unter Verwendung von Toxoplasma-Antigen zu untersuchen. Hammondia-infizierte Mäuse erbringen im SFT Titer bis zu 1:256, Toxoplasma-infizierte Tiere jedoch höhere Titer. WEILAND (1977) untersuchte an NMRI-Mäusen,

die er mit *Toxoplasma gondii* bzw. mit *Hammondia hammondi* infiziert hatte, den Verlauf der Antikörperbildung mit Hilfe des SFT, der Komplementbindungsreaktion (KBR), dem indirekten Hämagglutinationstest (IHA), dem indirekten Fluoreszenztest (IFAT) und dem Peroxidase-enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA). Als Antigen verwendete er vergleichend Toxoplasmen aus Mäuseaszites, käufliches *Toxoplasma gondii*-Antigen (Fa. Wellcome) sowie Eihautantigen. Kreuzreaktionen zwischen *Toxoplasma* und *Hammondia* traten im SFT, ELISA, IHA und KBR, zumindest am Anfang der Infektion, auf. Später hatten die Seren der latenten Toxoplasmaträger um 1 - 4 Stufen höhere Titer als die *Hammondia*-Tiere. Überraschenderweise traten im IFAT keine Kreuzreaktionen auf; er scheint demnach eine spezifische Methode, auch in niedrigen Titerstufen, zum Nachweis einer Hammondiose zu sein.

WALLACE (1975) befaßte sich mit den Kreuzreaktionen auch bei der Untersuchung menschlicher Seren im SFT und im IFAT. Da alle 95 Patientenseren sowohl mit dem Toxoplasma-Antigen als auch mit dem *Hammondia*-Antigen reagierten, konnte weder eine Toxoplasmose noch eine Mischinfektion ausgeschlossen werden. Seren mit hohen Toxoplasma-Titern im IFAT hatten auch hohe *Hammondia*-Titer.

DUBEY (1975 b) infizierte Hunde oral mit *Hammondia*-Oozyten und untersuchte vor und 4 Wochen nach der Infektion die Tiere serologisch im IHA. Da die Hunde in beiden Fällen lediglich Titer von 1:16 aufwiesen, ist es unwahrscheinlich, daß *Hammondia*-Infektionen in Hunden zu Fehldiagnosen in der Toxoplasmaserologie führen. EYDELLOTH (1977) verfütterte an Kaninchen *Hammondia hammondi*-Oozyten und konnte mit dem SFT Titer von 1:64 nachweisen.

Bei 2 von 4 experimentell mit Hammondia infizierten Läufer-schweinen beobachtete sie SFT Titer von 1:4 bzw. 1:16. Schließlich gab sie je 1.000.000 sporulierte Hammondia-Oozysten oral an 3 Schafe. Alle 3 Tiere zeigten am 4. Tage p. i. Krankheitserscheinungen wie hohes Fieber, Apathie, Anorexie, Polydipsie und erhöhte Puls- und Atemfrequenzen, die am Ende der 2. Woche p. i. wieder abgeklungen waren. 32 Tage später liessen sich SFT Titer von 1:256 nachweisen, obwohl die Verfütterung von Muskulatur dieser Tiere an Katzen zu keiner Oozystenausscheidung führte. EYDELLOTH (1977) vermutete, daß die Hammondia hammondi-Infektion zwar bei Schafen anging, es zunächst zu einer Parasitenvermehrung und damit zur Entwicklung von Antikörpern kam, daß aber dann die Hammondien abstarben, bevor Zysten sich entwickeln konnten.

Nach orientierenden Untersuchungen von WEILAND (1977) treten im IFAT keine Kreuzreaktionen zwischen Toxoplasma und Hammondia auf; Seren von mit Toxoplasma infizierten Mäusen reagierten nur mit dem homologen Antigen. Kontrolluntersuchungen von Seren der mit Hammondia angesteckten Nager mit homologem Antigen konnte er jedoch nicht durchführen, da Hammondia-Antigen in der erforderlichen Menge bisher nicht zur Verfügung steht. Im Rahmen meiner Arbeit sollte ich deshalb die Gewinnung von Hammondia-Antigen insbesondere mit Hilfe von Immunsuppressiva versuchen.

Zu den Immunsuppressiva werden Röntgenstrahlen, Kortisone, Alkylantien, Antimetabolite, Antimitotica und Antilymphozytenseren gerechnet.

Röntgenstrahlen wurden schon sehr früh zur Unterdrückung

immunologischer Vorgänge benutzt. MAYR und BUSCHMANN (1975) stellten übersichtlich Strahlenbelastung und Infektabwehr dar. Von den zellulären Elementen sind die Lymphozyten am empfindlichsten gegenüber einer Strahlenwirkung. Nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 25 Röntgen (R) kam es bei Kaninchen und anderen Tierarten zu einem deutlichen Absinken der Lymphozyten im Blut, mit einem Tiefpunkt bereits nach 18 - 24 Stunden. Die Regenerationszeit beträgt beim Kaninchen etwa 50 Tage, bei anderen Tierarten noch länger (JACOBSEN, 1954). Durch die Röntgenstrahlen wird eine Antikörperbildung in den aktivierten Lymphozyten dadurch gehemmt, daß die DNS-Synthese und damit die Weiterentwicklung undifferenzierter Zellen gestört wird. MAYR und BUSCHMANN (1975) stellten fest, daß die Antikörperbildung besonders stark beeinflußt wird, wenn die Bestrahlung 12 - 24 Stunden vor der Antigengabe erfolgt. Schon 1944 entdeckte NAIMANN, daß Ratten, die am Tage der Infektion mit *Trypanasoma lewisi* mit 300 bis 500 R bestrahlt wurden, eine verstärkte Parasitämie zeigten. Nach BENISON und COATNEY (1949) verliefen auch Infektionen mit *Plasmodium gallinaceum* nach einer Bestrahlung mit bis 600 R akut und Kücken zeigten eine wesentlich verstärkte Parasitämie, wenn die Bestrahlung am Tage der Infektion erfolgte. Schließlich konnte FRENKEL (1967) bei latent mit *Toxoplasma gondii* infizierten Hamstern durch Bestrahlung eine Immunität unterdrücken.

Auch Kortikosteroide haben in hohen unphysiologischen Dosen eine immunsuppressive Wirkung (MEDAWAR, 1968). Charakteristika sind die unspezifische katabole Wirkung auf den Eiweißstoffwechsel, die Verminderung der γ -Globuline, ein antiphlogistischer Effekt sowie eine Lymphozyto-

lyse (POTEL und BROCK, 1972). Sie setzen die Reaktionsfähigkeit des Organismus wesentlich herab. Kortison wurde schon von ERICHSEN und HARBOE (1953) zur Erleichterung der Isolierung von Toxoplasma benutzt. 1955 stellten dieselben Autoren fest, daß mit Kortison behandelte Mäuse niedrige Antikörpertiter gegenüber Toxoplasmen entwickelten. FRENKEL (1957) gelang es, eine durch einen virulenten Toxoplasma Stamm bedingte latente Infektion in eine letale Toxoplasmose überzuführen. JACOBS und MELTON (1953) konnten die Sterberate von mit Toxoplasma infizierten Mäusen durch Kortisongaben erhöhen. CENTURIER (1970) gelang es dagegen nicht, bei latent infizierten Mäusen durch Kortison eine Virulenzsteigerung der Toxoplasmen herbeizuführen.

Als dritte Gruppe von Immunsuppressiva greifen die Alkylantien in die DNS-Synthese ein, indem sie außer der DNS-Alkylierung möglicherweise auch zur Vernetzung von Basenpaaren führen (POTEL und BROCK, 1972). Von den alkylierenden Substanzen, die besondere Bedeutung für die Immunsuppression haben, ist das Cyclophosphamid zu nennen. Es bewirkt durch die Störung der DNS-Synthese eine Hemmung der Plasmazellvermehrung; dadurch tritt keine Antikörperbildung ein (POTEL und BROCK, 1972).

Die folgende Leukopenie, bedingt durch die Suppression der Leukozytenneubildung, trifft bei Applikation niedriger Mengen die Lymphozyten, in höheren Dosen auch die Granulozyten. Eine wirksame Immunsuppression durch Cyclophosphamidgabe soll (nach Mitteilung der Asta-Werke) von den Zeitpunkten 2 Tage vor bis 2 Tage nach der Antigenapplikation erreicht werden. CENTURIER (1970) überprüfte die Wirkung von Cyclophosphamid auf latente Toxoplasma-

Infektionen bei Mäusen; er konnte damit eine latente Infektion nicht beeinflussen. KRAUSE (1976) untersuchte *Leishmania donovani* Infektionen in kleinen Nagetieren; durch Behandlung seiner Versuchstiere mit Cyclophosphamid erreichte er eine geringe Vermehrung der Erreger und keine erhebliche Aktivierung der Infektion in Rötelmäusen. FINGER und EMMERLING (1968) stellten fest, daß eine einmalige intraperitoneale Injektion von 300 mg/kg Cyclophosphamid, appliziert am Tage der Immunisierung mit Schaferythrozyten, bei Mäusen sowohl die zelluläre Abwehr als auch die humorale Antikörper-Bildung unterdrückt.

Als weitere Immunsuppressiva gelten Antimetaboliten. Es handelt sich um Pharmaka, die im Zellstoffwechsel vorkommenden essentiellen Verbindungen in der Struktur so ähneln, daß es durch deren Ersatz zu Stoffwechselstörungen kommt. Wichtige Antimetaboliten sind die Purinanaloga z. B. Azathioprin. KRAUSE (1976) versuchte, mit Azathioprin Leishmanien in kleinen Nagetieren passagieren und vermehren zu können; er konnte jedoch die angestrebte Wirkung nicht erreichen. Auch CENTURIER (1970) gelang mit Azathioprin die Aktivierung einer latenten Toxoplasma-Infektion nicht.

Als weitere Immunsuppressiva werden Antimitotika eingesetzt. Das Vincristin^(R), aus der Immergrünart *Vinca rosea* Linn. gewonnen, hemmt wahrscheinlich die Mitose in der Metaphase. Das Präparat wird in der Humanmedizin zur Behandlung akuter Leukämien eingesetzt.

Schließlich gilt als immunsuppressiv wirkende Substanz auch Antilymphozytenserum (ALS). Es wird nach Injektion

lymphoider Zellen der Maus oder des Menschen aus Kaninchen bzw. Pferden gewonnen (MEDAWAR, 1968). Seine Wirkung liegt darin begründet, daß die Lymphozyten zerstört werden. GRAY und Mitarb. (1966) führen dies auf die spezifische Beeinflussung der Lymphozyten durch Zytotoxine, Agglutinine und Präzipitine zurück. Die Folge ist eine starke Lymphopenie.

CENTURIER (1970) erreichte mit ALS in Mäusen eine Virulenzsteigerung von Toxoplasmen, so daß eine latente Infektion tödlich ausging. ROMMEL (1969) konnte durch die Anwendung eines gegen Schweinelymphozyten gerichteten ALS die Immunitätsbildung gegen *Eimeria scabra* unterdrücken. FRENKEL (1967) hemmte mit Hilfe von ALS die Infektionsimmunität bei Toxoplasma-Infektionen. Auch OPPERMANN (1971) konnte in Hunden durch intraperitoneale Injektion von ALS eine kurzfristige Toxoplasma-Parasitämie erreichen.

Ich versuchte, mit Hilfe von Immunsuppressiva ein besseres Angehen von *Hammondia hammondi*-Zysten zu erreichen, um so für serologische Untersuchungen Antigen zu gewinnen. WALLACE (1975) isolierte *Hammondiazysten*, indem er Muskulatur von infizierten Mäusen zerkleinerte, mit physiologischer Kochsalzlösung vermischte und diese Suspension durch ein feinmaschiges Gaze-Netz gab. Aus dem Filtrat trennte er durch Sedimentation die in der Schwebe bleibenden Fleischteilchen von den kompakteren, sich ablagernden Zystozoiten. ERBER (1977) gewann Zystozoiten, indem er einige Gramm Muskulatur stark zerkleinerte, in einen Erlmeyer-Kolben mit 50 ml 0,25 % Trypsinlösung versetzte und bei 20 - 23° C für 30 Minuten inkubierte, die Lösung durch ein feinmaschiges Sieb abseigte und abzentrifugierte. Schließlich lassen sich mit der Gefrierschnitt-Technik (Kryostat) *Hammondia*-Zysten für den Fluoreszenztest gewinnen.

III Eigene Untersuchungen

Das Ziel meiner Arbeit besteht darin, nach entsprechender Vorbehandlung von NMRI-Mäusen mit Immunsuppressiva zu versuchen, eine so starke Hammondia-Zysten-Bildung zu erreichen, daß diese für die Durchführung des Fluoreszenztests als Antigen verwendbar sind.

A Material und Methodik

Als Versuchstiere verwendete ich männliche bzw. kastrierte NMRI-Mäuse der institutseigenen Zucht. Die Tiere waren bei Versuchsbeginn 7 - 12 Wochen alt, wogen 25 - 30 g und wurden in Makrolonkäfigen in Gruppen zu jeweils 10 - 30 Stück gehalten. Sie erhielten pelletiertes Fertigfutter (Altromin-Haltungsdiät Nr. 1310) und Wasser ad libitum. Die 5 zur Herstellung von Antilymphozystenserum verwendeten Kaninchen waren ausgewachsene, aber junge Tiere aus einer konventionellen Versuchstierzucht. Sie wurden in Einzelkäfigen gehalten; sie erhielten pelletierte Altromin-Haltungsdiät Nr. 2020 und Wasser ad libitum.

Die zur Gewinnung von Hammondia hammondi-Oozysten benutzten 4 Katzen entstammten der institutseigenen Zuchtgruppe und waren 6 Monate bis 2 Jahre alt. Sie wurden in Einzelkäfigen auf Rosten gehalten und erhielten ausschließlich standardisiertes Alleinfutter (Altromin-Haltungsdiät Nr. 5010) und Wasser. Die Entnahme der Kotprobe und die Reinigung der Käfige erfolgten täglich.

Das Infektionsmaterial, die Hammondia hammondi-Oozysten, waren von ROMMEL und v. SEYERL (1976) aus dem Kot einer natürlich infizierten Katze isoliert worden. Mit diesen hatte auch EYDELLOTH (1977) ihre Versuche zur Aufklärung

möglicher Zwischenwirte durchgeführt. Die Oozysten sind 11,7 - 17,5 x 10,2 - 14,6 μm groß; die Maße der in der Maus gebildeten Hammondia-Zysten variieren zwischen 44 - 100 x 32 - 45 μm . Die Präpatenz des verwendeten Hammondia hammondi-Stammes beträgt für die Katze 6 - 7 Tage.

Die Infektion der Katzen (zur Oozystengewinnung) erfolgte durch Verfütterung von mit Hammondia hammondi infizierten Mäusen. Ab 5. Tag p. i. untersuchte ich die Katzenkotproben täglich mit Hilfe der Zinkchlorid-Kochsalz-Flo-tation etwa 3 Wochen lang auf Oozysten. Diese wurden durch Abzentrifugieren angereichert, dreimal mit Wasser gereinigt und in einer Petrischale aufbewahrt. Nach der Sporulation innerhalb von 4 - 5 Tagen lagerte ich sie bei 4° C im Kühlschrank. Die Auszählung der Oozysten (Zahl der Oozysten pro ml Suspension) erfolgte mit Hilfe der McMaster-Zählkammer. Mit je 10.000 Oozysten wurden Mäuse oral infiziert. Um eine eventuelle Infektion mit den morphologisch nicht zu unterscheidenden Toxoplasmen auszuschließen, wurden vier Wochen später die Seren dieser Mäuse im Sabin Feldman-Test (SFT) auf Toxoplasma-Antikörper untersucht. Da die SFT-Titer lediglich zwischen 1:64 und 1:256 lagen und eine Mäusepassagierung negativ verlief, konnte eine Toxoplasma-Infektion ausgeschlossen werden.

Den Versuchsmäusen wurden 10.000 bzw. 15.000 sporulierte Oozysten mit einer Knopfkanüle oral verabreicht. Gleichzeitig bzw. 1 - 6 Tage vor und nach der Applikation erfolgte der Beginn der immunsuppressiven Behandlung. 49 - 70 Tage p. i. wurden die Versuchsmäuse getötet und untersucht.

Für histologische Untersuchungen konservierte ich Teile der Extremitätenmuskulatur und die Zungen der behandelten Tiere in 4 % Formalin. Die Paraffinschnitte wurden nach den üblichen Verfahren angefertigt, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und mikroskopisch untersucht. Als Maß für die Stärke des Hammondienbefalls wertete ich die Zahl der Zysten in der Zunge der Mäuse (bei Durchmusterung von 3 Schnitten).

Zum Nachweis von Hammondia-Zystozoen benutzte ich die künstliche Verdauung mit 0,25 %iger Trypsinlösung (BONIN, 1973), modifiziert nach ERBER (1977). Die Mäuse wurden gehäutet und der Magen-Darmtrakt entfernt; die restliche Maus zerkleinerte ich im Mixer und versetzte die Suspension mit 50 ml 0,25 %iger Trypsinlösung und bewegte diesen Ansatz in einem Erlmeyer-Kolben bei 21° C langsam 30 Minuten mit einem Magnetrührer. Dabei wurden das Muskelgewebe angedaut, die Zystenwände zerstört und die Zystozoen freigesetzt. Nach Abseihen und 10 Minuten langem Zentrifugieren bei 3.000 Umdrehungen wurde das Sediment dreimal mit Aqua dest. ausgewaschen. Nunmehr zählte ich die Zystozoen aus dem Sediment mit Hilfe einer Thomazählkammer.

Den indirekten Fluoreszenzantikörpertest führte ich in der von HALLMANN und BURKHARDT (1974) beschriebenen Weise durch. Als Antigen dienten Gefrierschnitte von Mäusezungen, die sich in den mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Paraffinschnitten stark mit Hammondienzysten durchsetzt gezeigt hatten. Als Konjugate benutzte ich Anti-Kaninchen- γ -Globulin, Anti-Maus- μ -Globulin, Anti-Schaf- γ -Globulin, Anti-Schwein- γ -Globulin (Behringwerke AG) und Anti-Canine Ig (Fa. Microbiological Associates); die Konjugate wurden 1:20 verdünnt. Als Fluochrom diente Fluor-

esceinisothiocyanat (FITC); die Muskulatur wurde mit Evans-Blau gegengefärbt.

Zur Immunsuppression benutzte ich Pharmaka verschiedener Wirkungsweisen. Aus der Gruppe der Kortikosteroide wählte ich Betametasondinatriumphosphat aus (Celestan solubile^(R) der Fa. Byk-Essex). Täglich wurden 0,025 ml/Tier 10 Tage vor bis 21 Tage nach der Infektion, bzw. vom 6. bis 21. Tag p. i. intramuskulär verabreicht. Zwei weitere Gruppen erhielten in gleicher Weise 0,05 ml/Tier/Tag Celestan.

Cyclophosphamid (N,N Bis -(2-choraethyl)-N,O-propylenphosphorsäureesterdiamid), Endoxan^(R) der Asta-Werke als Vertreter der alkylierenden Substanzen, verabreichte ich an Gruppen von 15 - 20 Mäusen in einer Dosierung von 0,3 ml/Maus intraperitoneal vom 1. bzw. 6. Tag der Infektion im Abstand von jeweils 6 Tagen ebenfalls 3 Wochen lang. In einem zweiten Durchgang mit derselben Versuchsanordnung wurde die Cyclophosphamiddosis um das Doppelte erhöht. Schließlich behandelte ich 3 weitere Gruppen wiederum mit 0,3 ml/Maus Endoxan^(R), beginnend am Infektionstag, am 3. Tag und am 6. Tag p. i.

Aus der Reihe der Antimetaboliten wählte ich Azathioprin (6- [(1-Methyl-4-nitro-5-imidazolyl) thio] purin), das Präparat Immurek^(R) der Fa. Deutsche Wellcome GmbH. Die Substanz wurde in sterilem pyrogenfreiem Aqua dest. gelöst und 21 Tage lang in Dosen von 0,15 mg/Maus intraperitoneal, beginnend am Infektionstage bzw. am 6. Tag p. i., in dreitägigem Rhythmus injiziert.

Aus der Gruppe der Antimitotika verwendete ich das

Vincristin^(R) (Fa. Eli-Lilly GmbH); die Versuchstiere erhielten ebenfalls in 2 Gruppen vom Tage der Infektion bzw. vom 6. Tag p. i., täglich 0,035 mg/Maus Vincristin^(R) intraperitoneal, drei Wochen lang.

Antilymphozytenserum (ALS) stellte ich nach der von MEDAWAR (1968) beschriebenen und von CENTURIER (1970) modifizierten Methode her. Sechs Wochen alte männliche Mäuse wurden thymektomiert. Die Drüsen reinigte ich unter der Lupe von Blut und Bindegeweberesten, gab sie durch ein Gasesieb von 45 μ m Maschenweite in sterile heparinhaltige Tyrodelösung und resuspendierte sie durch Abzentrifugieren auf ein kleines Volumen. Von der so gewonnenen Zellsuspension erhielten 5 Kaninchen intravenös 2 x 2 ml im Abstand von 14 Tagen. Jede Injektion enthielt mindestens 5×10^8 Thymozyten. Eine Woche nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen entblutet, ihre Seren 30 Minuten bei 56° C inaktiviert und danach steril filtriert. 4 Teile ALS adsorbierte ich an 1 Teil dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschener Mäuseerythrozyten; dadurch sollten noch vorhandene Antikörper gegen Mäuseerythrozyten abgebunden werden. Die Seren und Erythrozyten wurden 60 Minuten bei 37° C und anschließend 12 - 15 Stunden bei 4 - 6° C inkubiert, danach die Erythrozyten abzentrifugiert. Als Vorversuch injizierte ich von dem so gewonnenen ALS 0,5 ml, 4 x im Abstand von 3 Tagen, 5 männlichen Mäusen, um seine Wirkung auf das periphere Blutbild zu prüfen. 1 Stunde vor und 7 Tage nach der ersten Injektion entnahm ich den Versuchsmäusen Blut aus der Schwanzvene und bestimmte jedesmal die Gesamtzahl der Leukozyten /mm³ Blut mit Hilfe der Thomazählkammer und anhand eines Giemsa-gefärbten Blutausstriches das Differentialblutbild. Nach der Injektion von ALS war

die Gesamtzahl der Leukozyten konstant und die Zahl der Lymphozyten um circa 40 % gesunken. Die 5 Vorversuchsmäuse infizierte ich danach mit 10.000 *Hammondia hammondi*-Oozysten, so daß der Behandlungsbeginn 12 Tage vor der Infektion lag. Im Hauptversuch dagegen setzte ich 2 Versuchsgruppen von Mäusen an. Am Tage der Infektion bzw. am 6. Tag p. i. begann ich 0,5 ml ALS/Maus zu injizieren. Diese Dosis erhielten die Tiere, wie im Vorversuch, insgesamt 4 x im Abstand von 3 Tagen. Weiterhin überprüfte ich mit derselben Gesamtdosis und deren zeitlichen Verteilung ein von Fa. Cappel Laboratories gefertigtes Anti-Mouse-Rabbit Antithymocyte Serum auf seine immunsuppressive Wirkung an fünf Mäusen.

Beim Versuch einer Immunsuppression mittels Röntgenstrahlen wurden die Mäuse einer Ganzkörperbestrahlung unterzogen (60 KV in 5 Minuten bei 30 mA, 1,6 mm großen Kupferfilter und circa 20 cm Focusabstand, Gerät: Kristalloflex der Fa. Siemens). Der Bestrahlungstermin lag 24 Stunden vor bzw. 6 Tage nach der Infektion. Die Röntgenstrahlendosis betrug bei den einzelnen Versuchsgruppen 200 R, 400 R bzw. 800 - 1.000 R, der vermutlichen Dosis letalis ⁵⁰.

Weiterhin stellte ich Kontrollgruppen auf. 2 Gruppen von Mäusen wurden ebenfalls mit 10.000 Oozysten infiziert, um dadurch die Zahl der in der Zunge gebildeten Zysten ohne immunsuppressive Behandlung zu erhalten. Eine 3. Gruppe wurde weder mit *Hammondia*-Oozysten infiziert noch immunsuppressiv behandelt, sondern im Alter von 10 Wochen getötet und ihre Zungen histologisch auf *Hammondia*-Zysten untersucht, um dadurch eine natürliche *Hammondia*-Infektion der Institutsmäuse auszuschließen.

B Ergebnisse

Bei Vorversuchen an Mäusen hatte sich die Zunge als Prä-dilektionsstelle für Hammondia-Zysten erwiesen. Um die durchschnittliche Zahl der Zysten/Mäusezunge innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen erfassen und vergleichen zu können, untersuchte ich drei histologische Zungenschnitte, und addierte die höchste Zahl der Zysten in diesen Schnitten der Versuchsgruppe, dividierte diese Gesamtzahl dann durch die Anzahl der Mäuse der Versuchsgruppe. Außerdem stellte ich mit Hilfe der Trypsin-Verdauung die durchschnittliche Zahl von Zystozoiten /ml Maussuspension bzw. für die Versuchsgruppe fest. Bei diesen Vorversuchen wurden 2 Mäusegruppen zu je 13 bzw. 12 Tieren mit je 10.000 Oozysten infiziert, nach 49 Tagen getötet und in 3 histologischen Schnittpräparaten der Zungen die Hammondia-Zysten gezählt. Es ergab sich bei den 25 Tieren eine durchschnittliche Zystenzahl von 3/Zunge. Diese 25 Mäuse dienten für alle Versuchsgruppen als Kontrolle. Sechs weitere Tiere fungierten als Negativ-Kontrolle; in den Zungen dieser nicht experimentell mit Hammondia-Oozysten infizierten Mäuse konnte ich bei der entsprechenden Untersuchung keine Zysten nachweisen.

Um eine möglichst große Zahl von Hammondia-Zysten/Zunge zu erzielen, wurden jeweils mehrere Versuchsgruppen mit Röntgenstrahlen, mit Kortikosteroid, mit Cyclophosphamid, mit dem Antimetaboliten Azathioprin, mit einem Antimitikum sowie mit Antilymphozytenserum behandelt.

1. Röntgenstrahlen (200 - 1.000 R)

In 11 Versuchsreihen untersuchte ich den immunsuppressi-

Versuchs- gruppe Nr.	Zahl der Versuchs- tiere	Infektionsdosis (Zahl der Oozy- ster)	Röntgen- dosis (R)	Zeitpunkt der Bestrah- lung	Zahl der veren- deten Tiere (49.Tag p.i.)	Durchschnitt- liche Zahl von Zysten/Zunge
1	31	15.000	400	1 Tag	23	8,0
2	30	10.000	400	vor	13	12,0
3	15	10.000	400	der	5	9,5
4	15	10.000	800	Infek- tion	3	2,6
5	15	10.000	1.000	tion	10	2,6
6	15	15.000	1.000		9	2,9
7	15	10.000	200	6 Tage	12	10,3
8	15	10.000	200	nach	1	4,7
9	15	10.000	400	der	2	1,8
10	15	15.000	1.000	Infek- tion	9	4,0
11	15	10.000	1.000		9	2,9

Tabelle 1: Versuche an 11 Mäusegruppen zur Steigerung der Entwicklung der Entwicklung von Hammondia hammondi-Zysten mit Röntgenstrahlen

ven Einfluß von Röntgenstrahlen auf die *Hammondia hammondi*-Zystenbildung an jeweils 15 - 31 NMRI-Mäusen (Versuchsgruppen 1 - 11) nach einer gleichbleibenden Infektion mit je 10.000 - 15.000 *Hammondia*-Oozysten/Tier. Die Röntgendosis variierte ich von 200 R über 400 R bis zu 1.000 R. Die Ganzkörperbestrahlung erfolgte 1 Tag vor (Versuchsgruppen 1 - 6) bzw. 6 Tage (Gruppen 7 - 11) nach der Verabreichung der Oozysten. Eine Wiederholung einzelner Versuche war notwendig, da anfangs ein erheblicher Prozentsatz der Versuchstiere starb. Dem Tod gingen Kachexie, Apathie und Anorexie voraus. Weder in Nativpräparaten noch in den mit Giemsa gefärbten Peritoneal-Exsudat-Ausstrichen konnten Endozoiten nachgewiesen werden.

Eine Bestrahlung mit 400 R einen Tag vor der Infektion bewirkte eine erhebliche Vermehrung (8 - 12) der Zysten-zahl (Tabelle 1) gegenüber den Kontrollen im Vorversuch (3). Eine Erhöhung der Strahlendosis auf 800 und 1.000 R brachte schlechtere Ergebnisse (2,6 - 2,9 Zysten/Zungenschnitt). Eine Bestrahlung am 6. Infektionstag brachte nur bei der Versuchsgruppe 7 (mit 200 R) annähernd die gleichen Ergebnisse (10,3 Zysten/Zungenschnitt) wie bei der Gruppe 2. Bei Anwendung von 1.000 R (Versuchsgruppen 10 und 11) verendeten jeweils 9 von 15 Mäusen; die Tiere hatten starken Durchfall und waren kachektisch. Das Auswertungsergebnis war mit 2,9 - 4,0 Zysten unbefriedigend.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß eine der Infektion 24 Stunden vorausgehende Bestrahlung mit 400 R die *Hammondia hammondi*-Zystenbildung (Abb. 1) in ähnlicher Weise zu steigern vermag wie eine Bestrahlung mit 200 R

am 6. Tag p. i. Die einmal erzielten Ergebnisse ließen sich jedoch nicht reproduzieren.

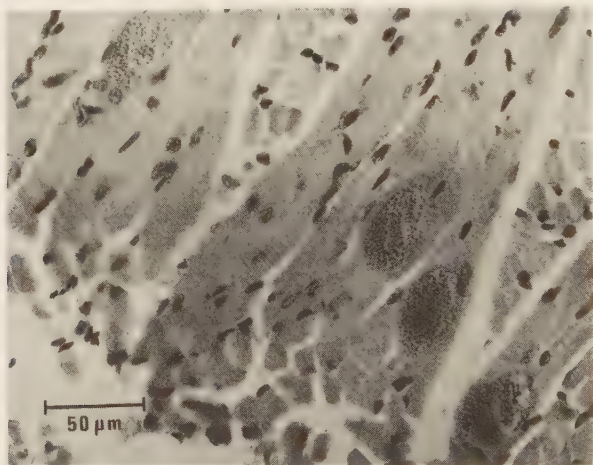


Abb. 1: Hammondia hammondi-Zysten in der Zunge einer mit 400 R bestrahlten Maus

2. Pharmaka

a) Betametasondinatriumphosphat

Mit den Versuchsgruppen Nr. 12 - 16 untersuchte ich den Einfluß des Betametasondinatriumphosphat (Celestan soluble) auf die Hammondia hammondi-Zystenbildung. Nachdem ich jeweils 15 Tiere der Versuchsgruppen Nr. 12 und 13 zehn Tage lang mit je 0,025 bzw. 0,05 ml Celestan/

Versuchs- gruppe Nr.	Zahl der Versuchs- tiere	Kortison- dosis ml/ Tier/Tag	Applika- tions- zeit	Zahl der veren- deten Tiere (49.Tag p.i.)	Durchschnitt- liche Zahl von Zysten/Zunge
12	15	0,025	10 Tage vor und 21 Tage nach der Infektion	1	0,8
13	15	0,05	6. - 27. Tag nach der In- fektion	2	2,8
14	15	0,025		1	7,5
15	20	0,025		-	10,7
16	14	0,05		-	0,5

Tabelle 2: Versuche an 5 mit je 10.000 Oozysten/Tier infizierten Mäuse-
gruppen zur Steigerung der Entwicklung von Hammondia hammondi-
Zysten mit Betametasondinatriumphosphat

Tier/Tag behandelt worden waren, infizierte ich sie am 11. Tag mit je 10.000 Oozysten und setzte die immunsuppressive Behandlung für weitere 3 Wochen fort. Nur 3 Versuchstiere verendeten; die erhaltene Zystenmenge (0,8 bzw. 2,8) befriedigte jedoch nicht (Tabelle 2). Wurde aber 0,025 ml Kortison erst 6 Tage nach erfolgter Infektion und dann für 3 Wochen gegeben (Versuchsgruppen 14 und 15), so konnte eine beachtliche Anzahl von Hammondia-Zysten in den Schnittpräparaten (im Durchschnitt 7,5 bzw. 10,7) festgestellt werden. Die tryptische Verdauung der Mäuse der Gruppe 14 erbrachte 2.300 Zystozoit/en/ml Maus-suspension. Dagegen lagen die Ergebnisse mit 0,05 ml Celestan/Tier/Tag (Versuchsgruppe 14) weit unter den Kontrollen (3 Zysten/Zungenschnitt).

Die Versuche zeigten, daß mit einer 3-wöchigen, am 6. Infektionstage beginnenden Kortisonbehandlung (0,025 ml Celestan/Tier/Tag) in NMRI-Mäusen die Bildung von Hammondia hammondi-Zysten erheblich gesteigert werden kann.

b) Cyclophosphamid

Unter den alkylierenden Substanzen wählte ich Cyclophosphamid aus und verwendete das Präparat Endoxan^(R) bei 8 Versuchsgruppen. In den ersten 2 Durchgängen (Versuchsgruppe 17 und 18) erhielten die Mäuse die erste Cyclophosphamiddosis (0,3 ml/Maus) und je 10.000 Oozysten am gleichen Tage. Alle 20 Mäuse der Versuchsgruppe Nr. 17 starben innerhalb von 21 Tagen nach starker Abmagerung, Apathie, Anorexie, Wachstumsstörungen und krustösen Augenverklebungen. Ich wiederholte den Versuch (Gruppe 18) mit 30 Mäusen, von denen diesmal unter denselben Symptomen 16 Tiere starben. Die Auswertung der restlichen

Versuchs- gruppe Nr.	Anzahl Versuchs- tiere	Cyclophos- phamid ml/Tier	Appl. Zeit Tag p.i.	Anzahl veren- deter Versuchs- tiere (49.Tag p.i.)	Durchschnitt- liche Zahl von Zysten/Zunge
17	20	0,3	Infek- -	20	-
18	30	0,3	tions- -	16	2,3
19	20	0,3	tag -	8	13,5
20	15	0,6	-	13	1,0
21	20	0,3	Infek- 3. tions- tag	2	8,8
22	20	0,3	-	4	2,0
23	29	0,3	Infek- 6. tions tag	17	11,6
24	16	0,6	-	11	3,6

Tabelle 3: Versuche an 8 mit je 10.000 Oozysten/Tier infizierten Mäusegruppen zur Steigerung der Entwicklung von Hammondia hammondi-Zysten mit Cyclophosphamid

14 Mäusezungen mittels Paraffinschnitten ergab 2,3 Zysten/Zunge, die tryptische Verdauung erbrachte 2.350 Zystozoit/en/ml Maussuspension. Erstaunlicherweise starben bei einer weiteren Wiederholung (Versuchsgruppe 19) von 20 Tieren nur noch 8; bei den Überlebenden zählte ich 13,5 Zysten/Zunge (Tabelle 3). Eine Erhöhung der Cyclophosphamidgabe auf 0,6 ml/Tier (Versuchsgruppe 20) brachte unbefriedigende Ergebnisse.

Die Tiere der Versuchsgruppe 21 behandelte ich mit 0,3 ml Endoxan erst am 3. Infektionstag. 2 Tiere starben interkurrent, ohne klinische Symptome gezeigt zu haben. Die Ausbeute von Zystenmaterial war mit 8,8/Zunge recht gut.

Eine Behandlung der Versuchstiere erst am 6. Infektionstag mit 0,3 ml bzw. 0,6 ml Endoxan ergab unterschiedliche Ergebnisse. In der Versuchsgruppe 22 traten nur geringe Tierverluste, aber auch eine unter den nicht behandelten Kontrollen liegende Zahl von Zysten auf. Die Wiederholung des Versuchs (Versuchsgruppe 23) erbrachte dagegen über 50 % Tierverluste und eine erstaunlich hohe Zystenanzahl von 11,6. Die Erhöhung der Dosierung auf 0,6 ml (Versuchsgruppe 24) vergrößerte die Tierverluste und verringerte wesentlich die durchschnittliche Zystenanzahl. Eine gewisse Steigerung der Zystenentwicklung durch 0,3 ml Cyclophosphamid/Tier konnte bei Mäusen erreicht werden, gleichgültig ob die Applikation am 1., 3. oder am 6. Infektionstag erfolgte. Die erheblichen Unterschiede in den Ergebnissen der einzelnen Versuchsgruppen lassen sich allerdings weder mit der Versuchsdurchführung noch mit dem Versuchstiermaterial erklären.

c) Azathioprin

In weiteren 2 Versuchsreihen überprüfte ich die Wirkung von Azathioprin auf die Hammondia-Zystenbildung.

Die 20 Tiere der Versuchsgruppe 25 bzw. die 21 Mäuse der Versuchsgruppe 26 wurden ebenfalls mit je 10.000 Oozysten infiziert. Die Mäuse der Gruppe 25 erhielten ab dem Infektionstag, diejenigen der Versuchsgruppe 26 ab dem 6. Tag p. i. in dreitägigem Abstand 3 Wochen lang 0,015 ml Azathioprin.

In der Gruppe 25 starben 13 Mäuse innerhalb von 16 Tagen, in der Gruppe 26 überlebten 6 Tiere. Die wenigen überlebenden Versuchstiere wiesen eine erstaunlich hohe Zysten-zahl (16,3 bzw. 13,2 Zysten/Zunge) auf.

d) Vincristin^(R)

In dieser Versuchsreihe überprüfte ich die Möglichkeit durch Behandlung mit Vincristin^(R) die Hammondia hammondi-Zystenbildung in NMRI-Mäusen zu steigern.

Die Versuchsgruppen Nr. 27 und 28 bestanden aus je 10 Tieren, die mit 10.000 Oozysten/Maus infiziert worden waren. Gruppe 27 erhielt ab dem Infektionstag 0,015 ml Vincristin^(R) i. p. täglich 3 Wochen lang, während Gruppe 28 mit der gleichen Dosis erst ab 6. Tag p. i. behandelt wurde. In der Gruppe 27 starben am 1. Tag p. i. 3, in der Gruppe 28 bis zum 6. Tag p. i. 4 Tiere. Die Auszählung der Zysten ergab 8,2 bzw. 9,3 Zysten/Mäusezunge.

3. Antilymphozytenserum (ALS)

In den Versuchsgruppen 29 - 32 untersuchte ich den immun-

Versuchs- gruppe Nr.	Zahl der Versuchs- tiere	ALS ml/Tier	Zeitpunkt der Behandlung	Zahl der veren- deten Tiere (49.Tag p.i.)	Durchschnittli- che Zahl von Zysten/Zunge
29	15	4 x 0,5	1.Tag p.i.	2	1,4
30	5	4 x 0,5	12.Tag a.i.	1	1,2
31	15	4 x 0,5	6. Tag p.i.	-	2,4
32	5	4 x 0,5		4	2,0

Tabelle 4: Versuche an 4 mit je 10.000 Oozysten/Tier infizierten Mäusegruppen zur Steigerung der Entwicklung von Hammondia hammondi-Zysten mit Antilymphozytenserum (ALS)

suppressiven Einfluß von Antilymphozytenserum auf die *Hammondia hammondi*-Zystenbildung.

Die 15 Mäuse der Gruppe 29 wurden mit je 10.000 Oozysten infiziert und erhielten 0,5 ml ALS am 1., 4., 7. und 10. Infektionstag. Bis zum 8. Tag p. i. starben 2 Mäuse. Bei der Auswertung fand ich durchschnittlich 750,0 Zoiten/ml Maussuspension und 1,4 Zysten/Zunge (Tabelle 4). Gruppe 30 bestand aus 5 Tieren, die erst nach Verabreichung der gesamten ALS-Menge mit je 10.000 Oozysten infiziert wurden. In den überlebenden 4 Mäusen zählte ich durchschnittlich 750 Zoiten und 1,4 Zysten/Zunge. Die Versuchsgruppe 31 (15 Mäuse) erhielt erst am 6. Tag nach der Infektion mit 10.000 Oozysten die erste von insgesamt 4 ALS-Dosen. Die Auswertung dieser 15 Tiere erbrachte 720 Zoiten/ml Maussuspension und 2,4 Zysten/Zunge. Den 5 Mäusen der Gruppe 32 injizierte ich ab 6. Tag p. i. ein käufliches ALS. Der Versuch ist nicht verwertbar, da 4 Tiere gestorben waren.

Die Versuche in ihrer Gesamtheit haben gezeigt, daß die Behandlung der Versuchstiere mit verschiedenen suppressiven Pharmaka (Tabelle 5) sowie eine Röntgenbestrahlung mit 400 R zu einer wesentlichen Steigerung der Bildung von *Hammondia*-Zysten führt.

Behandlung mit	Dosis	Zeitpunkt der Behandlung	Durchschnittliche Zahl von Zysten/Zunge
Röntgenstrahlen	400 R	1 Tag vor der Infektion	8 - 12
Betametasondinatriumphosphat	0,025 ml/Tier/Tag	10 Tage vor und 21 Tage nach der Infektion	7,5 - 10,7
Cyclophosphamid	0,3 ml/Tier/Tag	ab 1., 3. bzw. 6. Tag p.i. für 21 Tage	8,8 - 13,5
Azathioprin	0,015 ml/Tier jeden 3. Tag	ab 1. bzw. 6. Tag p.i. für 21 Tage	13,2 - 16,3
Vincristin (R)	0,015 ml/Tier/Tag	ab 1. bzw. 6. Tag p.i. für 21 Tage	8,2 - 9,3
Antilymphozytenserum	0,5 ml/Tier jeden 3. Tag	12 Tage a.i. bzw. 1. oder 6. Tag p.i. für 21 Tage	1,2 - 2,4
Kontrolle	---	---	3

Tabelle 5: Übersicht über den Wirkungsgrad der angewandten Immunsuppressiva. Als optimal erwies sich Azathioprin, mit dem bis zu 16 Zysten/Zunge erzielt werden konnten, während sich in unbehandelten Kontrolltieren im Durchschnitt lediglich 3 Zysten/Zunge entwickelten.

4. Überprüfung des Antigens im indirekten Fluoreszenz- test

Mit Hilfe des IFAT untersuchte ich Seren von Mäusen, Hunden, Kaninchen, Schweinen und Schafen, die mit *Hammondia hammondi*-Oozysten sowie Seren von Mäusen, Hunden und Kaninchen, die mit *Toxoplasma gondii*-Oozysten infiziert worden waren. Alle Seren wurden mit *Hammondia hammondi*-Antigen (Zysten in Gefrierschnitten) angesetzt. Ich fixierte die *Hammondia*-Gefrierschnitte mit Aceton/Äthanol, Carnoy und Hitze, wobei sich die Acetonfixierung mit Evans-Blau, verdünnt mit der gleichen Menge Puffer als die beste Art erwies. Hier traten die unspezifischen Nebenfluoreszenzen in geringerem Umfang auf.

Von je 60 Mäusen, die mit jeweils 4.000 *Hammondia*- bzw. 4.000 *Toxoplasma gondii*-Oozysten infiziert worden waren, wurden vom 1. - 34. Tag p. i. alle 3 Tage 5 Mäuse entblutet und die gepoolten Seren mit dem IFAT untersucht. Zuvor beschichtete ich die Gefrierschnitte mit 1:10 verdünnten Anti-Maus Serum der Fa. Behringwerke und inkubierte sie 1 Stunde in der feuchten Kammer. Die Seren zeigten ab dem 17. Infektionstag deutliche Titer. Am 32. Tag p. i. hatten die mit *Hammondia* infizierten Mäuse Titer bis 1:64, die *Toxoplasma*-Tiere Titer bis zu 1:16.000. Leider zeigten sich in allen Gefrierschnitten unspezifische Nebenfluoreszenzen, so daß klare Schlußfolgerungen aufgrund dieser Untersuchungen nicht möglich sind. Zudem traten erhebliche Kreuzreaktionen mit heterologen (*Toxoplasma*) Antikörpern auf.

Die Untersuchung der Seren von 3 mit je 1.000.000 sporulierten *Hammondia*-Oozysten infizierten etwa 3 Monate alten Beagles sowie von 3 mit 250.000 *Toxoplasma*-Oozysten

experimentell angesteckten Hunden verlief über 31 Tage im IFAT, bei Verwendung von Hammondia-Antigen, negativ. Ebenso konnte ich in Seren von 2 Ferkeln sowie 2 Schafen, die mit 1.000.000 Hammondia-Oozysten infiziert worden waren, keinerlei spezifische Titer nachweisen. Es ist anzunehmen, daß die künstliche Infektion bei diesen 3 Tierarten in unseren Fällen nicht angegangen ist.

Schließlich erfolgte die Überprüfung der Seren von 3 künstlich mit 100.000 Hammondia- und von 2 mit 40.000 Toxoplasma -Oozysten angesteckten Kaninchen im IFAT mit unserem Hammondia-Antigen. Bei den Hammondia-Tieren traten erstmals am 9. Tag p. i. Titer von 1:16 auf, welche auf 1:64 - 1:128 bis zum 30. Tag p. i. anstiegen (Tabelle 6).

Tabelle 6: Titerstufen im IFAT

Kanin- chen Nr.	infiziert mit Oozysten	Titer im IFAT am Infektionstag									
		3.	6.	9.	12.	15.	18.	21.	24.	27.	30.
1		-	-	1: 16	1: 32	1: 32	1: 32	1: 128	1: 128	1: 128	1: 128
2	100.000 Hammon- dia	-	-	1: 16	1: 16	1: 32	1: 32	1: 64	1: 64	1: 128	1: 128
3		-	1: 16	1: 16	1: 32	1: 32	1: 32	1: 32	1: 64	1: 64	1: 64
4	40.000 Toxo- plasma	-	1: 32	1: 32	1: 64	1: 64	1: 256	1: 256	1: 256	1: 256	1: 1024
5		-	1: 64	1: 128	1: 256	1: 256	1: 1024	1: 1024	1: 1024	1: 1024	1: 2048

Die Verfütterung dieser am 30. Infektionstag getöteten Tiere an bisher Hammondia-freie Katzen verlief in 2 Fällen positiv. Die beiden Toxoplasma-Tiere hatten Seren-Titer von 1:1024 - 1:2048; es traten also auch bei Kaninchen Kreuzreaktionen auf.

IV Besprechung der Ergebnisse

In Übereinstimmung mit BENISON und COATNEY (1949), die durch Bestrahlung von Küken die Immunantwort unterdrückten und eine starke Plasmodium lophurae-Parasitämie hervorriefen, gelang es mir, durch Röntgenbestrahlung (400 R), eine gesteigerte Hammondien-Zystenbildung in NMRI-Mäusen hervorzurufen.

Dieses Ergebnis konnte in 2 weiteren Versuchen gefestigt werden und läßt sich dadurch erklären, daß die Lymphozytenzahlen etwa 18 - 24 Stunden nach einer Bestrahlung besonders stark absinken. MAYR und BUSCHMANN (1975) stellten, wenn das Antigen einige Tage vor einer Bestrahlung verabreicht wurde, eine höhere Antikörperproduktion als bei unbestrahlten Kontrollen fest. So lassen sich auch die niedrigen Zystenahlen in den erst ab 6. Infektionstag bestrahlten Versuchsgruppen erklären. Allerdings zeigte sich in der Versuchsgruppe Nr. 7, die mit 200 R am 6. Tag p. i. behandelt wurde, eine ungewöhnlich hohe Zystenahl von 10,3. Dieses günstige Ergebnis ließ sich jedoch in der Versuchsgruppe Nr. 8 nicht reproduzieren. Es ist anzunehmen, daß bei Bestrahlungsdosen von 800 - 1.000 R, selbst wenn sie vor der Antigengabe verabreicht werden, das retikuloendotheliale System aktiviert wird und einen großen Teil der Infektion abfängt. Vielleicht führen aber auch hohe Strahlendosen zu einer starken Schädigung des Darmepithels (anhaltender Durchfall der Versuchstiere der Gruppen 4, 5, 10, 11), welche die Endodyogenie der Parasiten einschränkt.

Während es CENTURIER (1970) nicht gelang, durch Kortisonbehandlung eine Virulenzsteigerung der Toxoplasmen in Mäusen herbeizuführen, konnten FRENKEL (1957), JACOBS und

MELTON (1953) latente Toxoplasma-Infektionen in letale überführen. Auch ROMMEL (1969) gelang durch Kortisongaben, bei Reinfektion von Schweinen mit *Eimeria scabra*, ein Niederbruch der Immunität und damit eine erneute starke Oozystenausscheidung. Ich konnte die *Hammondia hammondi*-Zystenbildung durch Kortisonbehandlungen erhöhen. Wenn die Versuchstiere 10 Tage vor bis 21 Tage nach der Infektion mit 0,025 ml/Tier/Tag behandelt wurden, war die Zystenzahl gegenüber der Kontrollgruppe mehr als verdoppelt. Setzte die Applikation jedoch erst ab dem 6. Tag p. i. ein, lagen die Zystenzahlen sogar unter der Kontrollgruppe.

ROMMEL (1969) glaubt, daß Kortison zwar Antikörperbildung verhindert, aber bereits vorhandene Antikörper nicht angreift. Ich nehme dementsprechend an, daß der 6. Tag p. i. als Behandlungszeitpunkt zu spät gewählt war, um die schon aktivierte Immunabwehr zu unterdrücken.

FRENKEL (1957) gelang es nicht, durch Stickstofflost eine bereits ausgebildete Immunität zu durchbrechen. Auch CENTURIER (1970) konnte mit dem zur gleichen Gruppe der Zytostatika gehörenden Cyclophosphamid eine bereits gebildete Immunität gegen Toxoplasma nicht aufheben. KRAUSE (1976) gelang es ebenfalls nicht, die Vermehrung von Leishmanien in Nagern durch eine Cyclophosphamidbehandlung zu erreichen. Im Gegensatz dazu steigerte ich durch 0,3 ml Cyclophosphamid/Tier und alle 6 Tage ab 1. bzw. 3. oder 6. Tag p. i. injiziert, die *Hammondia hammondi* Zystenbildung in meinen Versuchstieren erheblich (8,8 - 13,5). Allerdings ließen sich diese Ergebnisse in weiteren Versuchen nicht reproduzieren. Die Dosis von 0,6 ml/Tier für 6 Tage war sicherlich zu hoch; dies bestätigen die erheblichen klinischen Symptome bei den Versuchstieren

sowie die hohe Todesrate.

Auch wenn CENTURIER (1970) und KRAUSE (1976) mit Azathioprin keine Erfolge erzielen konnten, gelang mir mit diesem Präparat eine starke Steigerung der *Hammondia hammondi*-Zystenbildung in NMRI-Mäusen (4 - 5 mal so viel Zysten wie in der Kontrollgruppe). Allerdings war die Todesrate in diesen Versuchsgruppen Nr. 25 und 26 mit 65 bzw. 72 % sehr hoch.

Bei der Anwendung von Vincristin^(R) waren die Ergebnisse von KRAUSE (1976) unbefriedigend. Ich konnte jedoch damit eine gewisse Steigerung der Zystenzahl erreichen.

Die nach MEDAWAR (1968) wirksamste Substanz zur Erzeugung einer Immuntoleranz ist Antilymphozytenserum (ALS). Erstaunlicherweise erreichte ich in keiner der 4 Versuchsgruppen Nr. 29 - 32 eine Steigerung der Zystenbildung; die Werte lagen sogar unter denjenigen der Kontrollgruppe, obwohl ich im Vorversuch ein Absinken der Lymphozytenzahl nach viermaligen Injektionen von 0,5 ml ALS beobachten konnte. ROMMEL (1969), CENTURIER (1970) und OPPERMANN (1971) erzielten positive Ergebnisse mit der Anwendung von ALS bei der *Eimeria scabra*- bzw. *Toxoplasma* -Infektion. Das Versagen des ALS in meinen Versuchen kann ich nicht erklären.

Die tryptische Verdauung brachte keine relevanten Zahlen für die Stärke der *Hammondia hammondi*-Zystenbildung. So stellte ich in der Gruppe Nr. 18 im Durchschnitt 2.350 Zystozoit/en/ml Maussuspension fest, während die histologische Auswertung der Paraffinschnitte im Mittel 2,3 Zysten/Mausezunge zeigte. Andererseits zählte ich ebenfalls 2.300 Zystozoit/en/ml Maussuspension bei den Tieren in der Gruppe Nr. 14, jedoch wesentlich größere Zystenzahlen

(7,5 Zysten/Zunge). Ich verzichtete deshalb bei den weiteren Versuchen auf die Auszählung der Einzelparasiten.

Bei der praktischen Verwendung der Zysten in den Zungenschnitten als Antigen konnten weder bei Hunden noch Schafen Antikörper nachgewiesen werden. DUBEY (1975 b) wies zwar nach, daß Hunde als Zwischenwirte für *Hammondia hammondi* infrage kommen, da nach Verfütterung von Muskulatur der mit *Hammondien* infizierten Hunde an Katzen diese Oozysten ausschieden. Auch hatten die Seren der Versuchshunde im IHA Titer von 1:16.

EYDELLOTH (1977) konnte bei 2 Schafen nach Verabreichung von 1.000.000 *Hammondia*-Oozysten mit Hilfe des SFT Titer von 1:256 feststellen; die Verfütterung der Muskulatur dieser Schafe an Katzen ergab jedoch keine Oozystenausscheidung. Da auch meine serologischen Untersuchungen negativ verliefen, erscheinen mir die Ergebnisse von EYDELLOTH (1977) zumindest überprüfenswert.

Auch 2 von 5 Schweinen entwickelten im Laufe der Versuche bei EYDELLOTH (1977) nach einer *Hammondien*-Infektion im SFT Titer von 1:16, aber nur ein Schwein löste bei 1 von 2 Katzen eine Oozystenausscheidung aus. Für meine negativen Ergebnisse bei der Untersuchung der Schweineseren im IFAT gibt es 2 Interpretationsmöglichkeiten. Entweder ging die Infektion bei den Schweinen nicht an, oder die von den Versuchsschweinen gebildeten Titer lagen unter 1:16. Lediglich Kaninchen und Mäuse bildeten im IFAT mit *Hammondien*-Antigen Titer. Allerdings traten bei beiden Tierarten Kreuzreaktionen mit *Toxoplasma gondii* auf.

V Zusammenfassung

Durch die Applikation von Immunsuppressiva und von Röntgenstrahlen wurde versucht, in Mäusen nach Infektion mit *Hammondia hammondi*-Oozysten die Bildung von *Hammondia*-Zysten erheblich zu steigern, um für die Durchführung des indirekten Fluoreszenzantikörpertestes Antigen zu gewinnen.

Eine Behandlung mit Betametasondinatriumphosphat, Cyclophosphamid oder mit Vincristin^(R) sowie die Bestrahlung der Versuchstiere mit 400 R erbrachten eine Verdreifachung der Zystenahl. Die besten Ergebnisse wurden mit der Applikation (jeden 3. Tag über 3 Wochen) von 0,015 ml Azathioprin/Tier erzielt. Während in einem histologischen Schnitt der Zunge der unbehandelten Kontrollmäuse durchschnittlich 3 Zysten nachzuweisen waren, erhöhte sich die Zystenahl nach Azathioprin - Behandlung auf 13 - 16. Viermalige Gaben von 0,5 ml Antilymphozytenserum hatten keinen steigernden Effekt.

Orientierende serologische Untersuchungen von experimentell mit *Hammondia* infizierten Mäusen und Kaninchen bestätigten die Brauchbarkeit des Antigens für den Nachweis eines *Hammondia*-Befalls im Fluoreszenztest; es traten allerdings Kreuzreaktionen mit dem nahe verwandten *Toxoplasma gondii* auf.

Summary

H. Bruse: Attempts to achieve increased production of *Hammondia hammondi* cysts by means of immunosuppression in NMRI-mice.

In order to increase the production of *Hammondia* cysts which should serve as antigen for the IFAT, mice infected with *Hammondia hammondi* oocysts were subjected to x-rays and treatment with immunosuppressive agents.

The treatment with betametasonedisodiumphosphate, cyclophosphamide or vincristine as well as the irradiation of these animals with 400 R led to a three-fold production in the number of cysts. The best results were obtained by the application of 0,015 ml azathioprine per animal. While in histological sections of tongues of untreated control mice an average of three cysts was observed, the number of cysts found after the treatment with azathioprine for three weeks was 13 to 16. No increased production of cysts resulted from treating the animals four times with 0,5 ml antilymphocyte serum.

Serological investigations on mice and rabbits infected experimentally with *Hammondia*, confirmed the suitability of the antigen for the detection of *Hammondia* infection by means of IFAT. However cross reactions occurred with the closely related *Toxoplasma gondii*.

VI LITERATURVERZEICHNIS

1. BENISON, B. E., und G. R. COATNEY (1949): Effects of x-irradiation of *Plasmodium gallinaceum* and *Plasmodium lophurae* infections in young chicks. *J.NAT.Malaria Soc.* 8, 280-289
2. BOCH, J., D. KÜHN, M. ROMMEL und G. WEILAND (1974): Toxoplasma-Infektionen bei Haustieren und ihre Bedeutung für die Toxoplasmose des Menschen. *Münch. med. Wschr.* 116, 1477-1480
3. BOCH, J. und R. SUPPERER (1977): Veterinärmedizinische Parasitologie.
2. Auflage. Verlag Paul Parey, Berlin/Hamburg
4. BONIN, O. (1973): Quantitativ - virologische Methodik. Verlag Georg Thieme, Stuttgart
5. CENTURIER, C. (1970): Untersuchungen über die Möglichkeit der Beeinflussung latenter Toxoplasmainfektionen bei NMRI-Mäusen durch Immunsuppressiva. *Vet. med. Diss. FU Berlin*
6. DUBEY, J. P. (1975 a): Immunity to *Hammondia hammondi* infection in cats. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 167, 373-377
7. DUBEY, J. P. (1975 b): Experimental *Hammondia-hammondi* infection in dogs. *Brit. Vet. J.* 131, 741-743
8. DUBEY, J. P. (1976): A review of *Sarcocystis* of domestic animals and other coccidia of cats and dogs. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 169, 1061-1078
9. DUBEY, J. P., and R. FAYER (1976): Development of *Isospora bigemina* in dogs and other animals. *Parasitology* 73, 371-380
10. DUBEY, J. P. and R. H. STREITEL (1976): Further studies on the transmission of *Hammondia hammondi* in cats. *J. Parasitol.* 62, 548-551
11. ERBER, E. (1977): Möglichkeiten des Nachweises und der Differenzierung von zwei *Sarcocystis*-Arten des Schweines. *Berl. . Münch. Tierärztl. Wschr.* 90, 480-482

12. ERICHSEN, S., and A. HARBOE (1953): Toxoplasmosis in chickens: An epidemic outbreak of toxoplasmosis in a chicken flock in South Eastern Norway. Acta. path. Microbiol. scand. 33, 56-71
13. ERICHSEN, S., and A. HARBOE (1955): Toxoplasmosis in chickens. VI. International Congress for Microbiology, Roma 1953
14. EYDELLOTH, M. (1977): Experimentelle Untersuchungen über das Wirtsspektrum von Hammondia hammondi. Vet. med. Diss., München
15. FINGER, H., und P. EMMERLING (1968): Einfluß von Bordetella pertussis auf das lymphatische Gewebe von Mäusen. IV. Der Einfluß von Bordetella pertussis auf die Kinetik der Antikörperbildung bei mit Cyclophosphamid behandelten Mäusen. Immun. Forsch. 136, 351-361
16. FRENKEL, J. K. (1957): Effects of cortisone, total body irradiation, nitrogen mustard on chronic latent toxoplasmosis. Am. J. Path. 33, 618-619
17. FRENKEL, J. K. (1967): Adoptive immunity to intracellular infection. J. Immun. 98, 1309-1319
18. FRENKEL, J. K. (1977): Besnoitia wallacei of cats and rodents. With a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidia. J. Parasit. 63, 611-628
19. FRENKEL, J. K., and J. P. DUBEY (1975 a): Hammondia hammondi gen. nov., sp. nov., from domestic cats, a new coccidium related to Toxoplasma and Sarcocystis. Z. Parasitenk. 46, 3-12
20. FRENKEL, J. K., and J. P. DUBEY (1975 b): Hammondia hammondi: a new coccidium producing cysts in muscle of other mammals. Science 189, 222-224
21. GRAY, J. G., A. P. MONACO, M. L. WOOD, and P. S. RUSSEL (1966): Studies on heterologous anti-lymphocyte serum in mice. J. Immun. 96, 217-228

22. HALLMANN, L., und F. BURKHARD (1974): Klinische Mikrobiologie.
Verlag Georg Thieme, Stuttgart
23. HEYDORN, A.-O. (1973) : Zum Lebenszyklus der kleinen Form von Isospora bigemina des Hundes. I. Rind und Hund als mögliche Zwischenwirte.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 86, 323-329
24. HEYDORN, A.-O., R. GESTRICH und V. IPCZYNSKI (1975): Zum Lebenszyklus der kleinen Form von Isospora bigemina des Hundes. II. Entwicklungsstadien im Darm des Hundes.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 88, 449-453
25. JACOBS, L., and M. L. MELTON (1953): The effect of cortisone in murine toxoplasmosis.
J. Parasit. 39, Suppl.12
26. JACOBSON, L. O. (1954): Radiation Biology.
Mc Graw Hill, New York
27. KRAUSE, L. (1976): Leishmania donovani in kleinen Nagetieren.
Vet. med. Diss., München
28. MAYR, A., und H. BUSCHMANN (1975): Strahlenbelastung und Infektabwehr.
Forschungsbericht aus der Wehrmedizin, 2
29. MEDAWAR, P. B. (1968): Immunsuppressive Substanzen.
Abbottempo 1, 3-7
30. MILLER, N. L., J. K. FRENKEL, and J. P. DUBEY (1972): Oral infections with Toxoplasma cysts and oocysts in felines, other mammals and birds.
J. Parasit. 58, 928-937
31. NAIMANN, D. N. (1944): Effects of x-irradiation of rats upon their resistance to Trypanasoma lewisi.
J. Parasit. 30, 209-228
32. OPPERMANN, W. H. (1971): Versuche zur experimentellen Infektion des Hundes mit Toxoplasma-Oozysten.
Vet. med. Diss., FU Berlin
33. POTEL, J., und N. BROCK (1972): Zur Pharmakologie der chemischen Immunsuppression.
Z. Rheumaforschung 31, Suppl.2, 339-357

34. ROMMEL, M. (1969): Untersuchungen über Infektionsverlauf sowie Ausbildung und Natur der Immunität an experimentell mit *Eimeria scabra* (Henry, 1931) und *E. polita* (Pellérdy, 1949) infizierten Schweinen.
Vet. med. Habil. Schrift, FU Berlin
35. ROMMEL, M., und F. v. SEYERL (1976): Der erstmalige Nachweis von *Hammondia hammondi* (Frenkel und Dubey, 1975) im Kot einer Katze in Deutschland.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 89, 398-399
36. SHEFFIELD, H. G., M. L. MELTON, and F. A. NEVA (1976): Development of *Hammondia hammondi* in cell cultures.
Proc. Helminth. Soc. Wash. 43, 217-225
37. TADROS, W., and J. J. LAARMANN (1976): Sarcocystis and related coccidian parasites: a brief general review, together with a discussion on some biological aspects of their life cycles and a new proposal for their classification.
Acta Leidensia 44, 1-107
38. WALLACE, G. D. (1973): Sarcocystis in mice inoculated with Toxoplasma-like oocysts from cat feces.
Science 180, 1375-1377
39. WALLACE, G. D. (1975): Observations on a feline coccidium with some characteristics of Toxoplasma and Sarcocystis.
Z. Parasitenk. 46, 167-178
40. WEILAND, G. (1977): Serological correlation between the cystforming coccidia *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi*.
I. Mediterranean Conf. Parasitology, 5.-10. Oct. 1977, Izmir.

LEBENS LAUF

Am 24.11.1950 wurde ich als drittes Kind des Rechtsanwaltes und Notars Dr. Walter Bruse und seiner Ehefrau Mechthilde, geb. Voß in Itzehoe/Holstein geboren.

Ab Ostern 1957 besuchte ich die Volksschule, ab Ostern 1961 das neusprachliche Gymnasium der Auguste Viktoria-Schule in Itzehoe. Im Mai 1971 legte ich die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1971/72 begann ich an der Universität München das tierärztliche Studium. Im April 1974 legte ich das Physikum und im Juni 1977 die tierärztliche Prüfung ab. Am 13.7.1977 erhielt ich die Approbation als Tierärztin.

Seit Juli 1977 bin ich am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Universität München mit der Anfertigung meiner Dissertation beschäftigt.

Herr Prof. Dr. M. Rommel, der die Anregung zu dieser Arbeit gegeben und mich vor seiner Berufung nach Hannover betreut hat, sowie Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch danke ich herzlich für die jederzeit gewährte Unterstützung. Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. K. Tempel, der die Bestrahlung meiner Versuchstiere übernahm. Ferner danke ich vielen Mitarbeitern des Instituts für ihre freundliche Hilfe, sachkundigen Rat und wertvolle technische Mitarbeit.

